

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA VIRUS GÂY RA DỊCH TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN (PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA - PED) TẠI QUẢNG TRỊ, THÁI NGUYÊN VÀ THÁI BÌNH TỪ NĂM 2013 - 2014

Nguyễn Trung Tiến¹, Vũ Thị Thu Hằng², Huỳnh Thị Mỹ Lệ³, Nguyễn Bá Hiên³, Lê Văn Phan^{3*}

¹*Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc Thú y Trung Ương, Cục Thú y*

²*Công ty Cổ phần Phát triển Công nghệ Nông thôn (RTD)*

³*Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: letranphan@gmail.com

Ngày gửi bài: 22.07.2015

Ngày chấp nhận: 12.10.2015

TÓM TẮT

Dịch tiêu chảy cấp tính trên lợn (Porcine Epidemic Diarrhea- PED) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm do một loại virus thuộc họ *Coronaviridae* gây ra. Dịch PED xảy ra quanh năm nhưng thường phổ biến hơn vào mùa đông và trên 90% ca bệnh xảy ra ở lợn con dưới 7 ngày tuổi. Trong nghiên cứu này 148 mẫu bệnh phẩm là các mẫu phân và ruột của lợn nghi mắc bệnh PED thu thập được từ 3 tỉnh là Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình từ năm 2013 - 2014 đã được chẩn đoán bằng phương pháp RT-PCR. Kết quả chẩn đoán cho thấy 57/148 (38,51%) mẫu bệnh phẩm dương tính với virus PED. Kết quả phân tích trình tự nucleotide (nt) và amino acid (aa) trên cơ sở giải trình tự một phần gene S (spike gene) cho thấy các chủng virus PED thu thập được trong nghiên cứu này có tỷ lệ tương đồng về nt và aa rất cao khi so sánh với các chủng virus PED tham chiếu khác trước đây của Việt Nam, tỷ lệ tương đồng nt từ 94,8 - 98,6% và aa từ 93,5 - 98,8%. Kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy các chủng virus PED trong nghiên cứu này thuộc nhóm G1-1.

Từ khóa: Dịch tiêu chảy cấp tính trên lợn (Porcine Epidemic Diarrhea- PED), gene S (spike gene), cây phả hệ (phylogenetic tree).

Molecular Characterization of The Porcine Epidemic Diarrhea Viruses Isolated in Quang Tri, Thai Nguyen, and Thai Binh During 2013 - 2014

ABSTRACT

Porcine Epidemic Diarrhea (PED) is a serious and contagious swine disease caused by a virus of *Coronaviridae* family. PED occurs throughout the year but more common in winter season and over 90% of cases occur in less than 7 day old piglets. In this study, 148 samples of faeces and intestines collected from PED-suspected pigs in the 3 provinces of Quang Tri, Thai Nguyen and Thai Binh during 2013 - 2014 were diagnosed by the RT-PCR method. The diagnostic results showed that 57/148 (38,51%) samples were positive with the PED virus. The nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) analyses based on the partial spike (S) gene sequencing showed that the present PED virus strains were closely related to the reference PED virus strains collected in Viet Nam previously, sharing 94.8 - 98.6% in nt and 93.5 - 98.8% in aa. The phylogenetic analysis revealed that all the present PED virus strains belonged to the group G1-1.

Keywords: PED, phylogeny, spike gene (S).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dịch tiêu chảy cấp tính trên lợn (Porcine Epidemic Diarrhea- PED) là một bệnh truyền

nhiễm cấp tính nguy hiểm do một loại virus thuộc họ *Coronaviridae* gây ra. Dịch PED đã và đang gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng đối với ngành chăn nuôi lợn ở nhiều quốc gia trên thế

giới (Laude and Vautherot, 1993). Dịch PED lần đầu tiên được phát hiện ở Anh vào năm 1971, sau đó các ổ dịch liên tục được phát hiện và xảy ra phổ biến ở các quốc gia Châu Âu khác như Bỉ, Đức, Pháp, Hà Lan, Thụy Sĩ và ở Châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Thái Lan (Chen et al., 2008; Chen et al., 2010; Puranaveja et al., 2009; Song and Park, 2012). Ở Việt Nam, dịch PED lần đầu tiên được phát hiện vào năm 2008 và từ đó đến nay dịch bệnh thường xuyên xảy ra và gây ra ảnh hưởng nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn cả nước. Các chủng virus PED (PEDV) phân lập được từ Việt Nam được cho là có mối quan hệ gần gũi với các chủng PEDV phân lập từ Thái Lan, Trung Quốc, Hàn Quốc và Philippines (Vui et al., 2014).

Virus PED là virus thuộc nhóm 1, chi Alphacoronavirus, họ Coronaviridae. Hệ gene virus là RNA sợi đơn dương với kích thước khoảng 28kb, bao gồm đầu 5' (UTR), đuôi 3' poly A và có ít nhất 7 khung đọc mở (ORFs) mã hoá cho 4 protein cấu trúc là Spike (S), envelope (E), membrane (M), nucleoprotein (N) và 3 protein không cấu trúc (replicase 1a, 1b và ORF3) được sắp xếp theo thứ tự 5'-Rep-S-ORF3-E-M-N-3' (Duarte and Laude, 1994; Duarte et al., 1994; Laude and Vautherot, 1993; Laude, 1994; Pensaert and De Bouck, 1978; Spaan et al., 1988).

Protein S của virus PED là glycoprotein type I có kích thước 1.383 amino acids, bao gồm một đoạn peptide tín hiệu (signal peptide: 1-18 aa), các vùng chứa nhóm quyết định kháng nguyên sinh kháng thể trung hoà (neutralizing epitopes: 499-638, 748-755, 764-711 và 1368-1374 aa), một vùng xuyên màng (transmembrane domain: 1334-1356 aa) và một vùng ngắn phía trong màng (cytoplasmic) (Chang et al., 2002; Sun và Chen, 2008; Duarte et al., 1994; Song and Park, 2012). Tương tự như protein S của các *coronavirus* khác, protein S của virus PED là kháng nguyên bề mặt virus, đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sự tương tác với thụ thể glycoprotein của tế bào chủ khi xâm nhiễm, cũng như chứa các vùng quyết định kháng nguyên kích thích

tạo kháng thể trung hoà của vật chủ trong tự nhiên (Chang et al., 2002; Godet et al., 1994). Do vậy, protein S có thể được lựa chọn để phát triển các loại vaccine chống lại virus PED (Park et al., 2007; Spaan et al., 1988). Gene S mã hóa cho protein S là gene được sử dụng phổ biến để đánh giá mối quan hệ di truyền cũng như sự tiến hóa của các chủng virus PED đang lưu hành. Trong nghiên cứu này, một phần gene S của các chủng virus PED thu thập được từ 3 tỉnh (Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình) từ năm 2013 - 2014 đã được giải trình tự gene, được phân tích và so sánh về trình tự nucleotide (nt) và amino acid (aa) với các chủng virus PED tham chiếu khác.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu bệnh phẩm là các mẫu ruột non, chất chứa đường ruột và phân của lợn nghi nhiễm bệnh tiêu chảy cấp PED được thu thập tại các trại chăn nuôi lợn thuộc 3 tỉnh gồm Thái Nguyên, Thái Bình và Quảng Trị. Mẫu bệnh phẩm được vận chuyển về phòng thí nghiệm ở điều kiện 4 - 8°C và được bảo quản trong các ống (tube) vô trùng ở nhiệt độ -20°C.

2.2. Tách chiết RNA của virus PED từ các mẫu bệnh phẩm

Trizol (Invitrogen) được dùng để tách chiết RNA của PEDV, các bước được tiến hành theo sự chỉ dẫn Kit, cụ thể bổ sung 800µl dung dịch Trizol vào 200µl huyền dịch virus, vortex và sau đó bổ sung tiếp 200µl dung dịch Chloroform, vortex mạnh trong 15 giây, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Huyền dịch trên được ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Sau khi ly tâm, chuyển pha trên có chứa RNA vào một ống Eppendorf mới (với lượng khoảng 500µl). Tủa RNA của virus bằng cách bổ sung 500µl dung dịch Isopropanol, ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Rửa tủa RNA bằng 1ml dung dịch Ethanol 70%, ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Hòa RNA trong 30µl nước vô trùng đã loại *Rnase* và bảo quản ở -20°C.

2.3. Tổng hợp cDNA

cDNA được tổng hợp từ RNA đã được tách chiết nhờ enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase). Để tạo cDNA, sử dụng bộ Kit SuperScript™ (Invitrogen) và môi (primer) Oligo dT với trình tự 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATTTTTTTT TTTTTTTTT-3'. Thành phần phản ứng và điều kiện tổng hợp cDNA như sau: 5µl RNA tinh sạch, 4,5µl nước đã loại RNase, 3µl dNTPs (2,5mm mỗi loại), 2µl mỗi oligo dT (200 pM/µl), 1µl Superscript™ II RNase H-reverse transcriptase (200 U/µl), 0,5µl RNase inhibitor (10 U/µl) và 4µl 5x first strand buffer. Phản ứng tổng hợp cDNA được thực hiện ở 37°C trong 60 phút và sau đó 94°C trong 5 phút.

2.4. PCR và giải trình tự gene (sequencing)

cDNA đã tổng hợp ở trên được bổ sung trực tiếp vào ống phản ứng PCR sử dụng Kit AccuPower PCR PreMix (BIONEER). Kit này chứa DNA taq-polymerase và các thành phần cần thiết cho quá trình khuếch đại DNA. Mỗi sử dụng trong phản ứng PCR để nhân đoạn gene S là cặp mỗi P1/P2 (trình tự mỗi xuôi P1: 5'-TTCTGAGTCACGAACAGCCA-3', trình tự mỗi ngược P2: 5'-CATATGCAGCCTGCTCTGAA-3') đã được công bố trước đây bởi Kim et al. (2001). PCR được thực hiện theo chương trình như sau: 30 chu kỳ (94°C - 1 phút, 54°C - 1 phút, 72°C - 1 phút) và cuối cùng 8 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR sẽ được kiểm tra trên gel agarose và được

gửi sang công ty Macrogen của Hàn Quốc để tiến hành giải trình tự gene. Trình tự ADN thu được sẽ được phân tích bằng phần mềm BioEdit và DNASTar. Trên cơ sở trình tự gene S của các chủng virus PED thu được, chúng tôi sẽ xây dựng cây phả hệ bằng phần mềm MEGA 5 theo phương pháp Neighbour-joining với giá trị Bootstrap bằng 1000.

3. KẾT QUẢ

3.1. Chẩn đoán virus PED từ các mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp RT-PCR

Mẫu bệnh phẩm là ruột và phân của lợn nghi mắc bệnh PED đã được chẩn đoán bằng phương pháp RT-PCR. Kết quả ở bảng 1 cho thấy có 57/148 (38,51%) mẫu bệnh phẩm thu thập được từ 3 tỉnh Thái Bình, Quảng Trị, và Thái Nguyên dương tính với phản ứng RT-PCR.

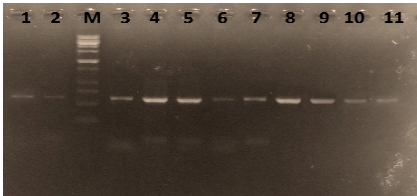
3.2. Phân tích trình tự gene S và xây dựng cây phân phả hệ (phylogenetic tree)

Nghiên cứu dịch tễ học phân tử trên cơ sở phân tích về trình tự nucleotide và axit amin cũng như phân tích về cây phả hệ dựa trên trình tự gene S là cơ sở quan trọng nhằm đánh giá sự biến đổi di truyền của các chủng virus PED đang lưu hành ngoài thực địa, từ đó đánh giá sự biến chủng của virus theo thời gian. Trong nghiên cứu này cặp mỗi P1/P2 (Kim et al., 2001) đã được sử dụng để nhân đoạn gene S của sản phẩm PCR tương ứng là 651bp (Hình 1).

Bảng 1. Kết quả chẩn đoán PEDV trong các mẫu bệnh phẩm

Nguồn gốc		Số mẫu	Số mẫu dương tính	Tỉ lệ (%)
Thái Bình	Ruột	12	6	50
	Phân	61	19	31,14
	Tổng	73	25	34,25
Quảng Trị	Ruột	0	0	0
	Phân	43	20	46,51
	Tổng	43	20	46,51
Thái Nguyên	Ruột	6	3	50
	Phân	26	9	34,62
	Tổng	32	12	37,50
Tổng		148	57	38,51

Một số đặc điểm sinh học phân tử của virus gây ra dịch tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea - PED) tại Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình từ năm 2013 - 2014



Hình 1. Kết quả chạy điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Ghi chú: M: Marker DNA (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); giếng 1 - 11: Các mẫu bệnh phẩm tương ứng là HUA-PED45, HUA-PED47, HUA-PED55, HUA-PED56, HUA-PED58, HUA-PED60, HUA-PED63, HUA-PED65, HUA-PED67, HUA-PED69, và HUA-PED80.

Sản phẩm PCR thu được từ 11 mẫu bệnh phẩm khác nhau (Bảng 2) sau đó đã được tiến hành giải trình tự gene và được phân tích về trình tự nt cũng như aa.

Kết quả phân tích trình tự nt của gene S cho thấy virus PED từ 2 mẫu bệnh phẩm HUA-PED45 và HUA-PED47 thu thập được ở Thái Bình vào năm 2013 có sự tương đồng với nhau rất cao (99,6%), chỉ có sự sai khác ở 2 vị trí nucleotide là 1916 (C $\leftrightarrow$ T) và 1987 (T $\leftrightarrow$ A). Khi so sánh trình tự gene S của virus PED ở Thái Bình với virus PED từ mẫu bệnh phẩm thu thập được ở Thái Nguyên năm 2014 cho thấy mức độ tương đồng về trình tự gene thấp hơn (97,4 - 97,8%), có đến 11 vị trí nucleotide sai khác (1539: A $\leftrightarrow$ C, 1556: A $\leftrightarrow$ G, 1559: A $\leftrightarrow$ C, 1635: T $\leftrightarrow$ C, 1812: G $\leftrightarrow$ T, 1831: T $\leftrightarrow$ G, 1834: A $\leftrightarrow$ G, 1928: A $\leftrightarrow$ G,

2016: C $\leftrightarrow$ T, 2019: G $\leftrightarrow$ A, 2043: C $\leftrightarrow$ T) (Bảng 3 và Hình 2). Như vậy, kết quả này cho thấy ở cùng khu vực phía Bắc nhưng ở hai mốc thời gian khác nhau và ở hai tỉnh khác nhau đã có sự biến đổi trình tự gene S của các chủng virus PED đang lưu hành. Khi so sánh trình tự gene S giữa các chủng virus PED thu thập được ở Quảng Trị với nhau cho thấy mức độ tương đồng về nucleotide rất cao, từ 97,8 - 100%. Khi so sánh các chủng này với 2 chủng virus PED thu thập ở Thái Bình năm 2013 cho thấy mức độ tương đồng về gene S thấp hơn (95,9 - 97,6%), có đến 19 sự sai khác trình tự nucleotide. Tương tự khi so sánh trình tự gene S của các chủng virus PED ở Quảng Trị với chủng virus PED ở Thái Nguyên cho thấy mức độ tương đồng về nucleotide giao động từ 96,8 - 97,8% (Bảng 3).

Bảng 2. Thông tin các mẫu bệnh phẩm dùng để phân tích trình tự nt và aa

STT	Tên mẫu	Năm	Nguồn gốc
1	HUA-PED45	2013	Thái Bình
2	HUA-PED47	2013	Thái Bình
3	HUA-PED55	2014	Quảng Trị
4	HUA-PED56	2014	Quảng Trị
5	HUA-PED58	2014	Quảng Trị
6	HUA-PED60	2014	Quảng Trị
7	HUA-PED63	2014	Quảng Trị
8	HUA-PED65	2014	Quảng Trị
9	HUA-PED67	2014	Quảng Trị
10	HUA-PED69	2014	Quảng Trị
11	HUA-PED80	2014	Thái Nguyên

Ghi chú: Dấu (.) biểu thị trình tự nucleotide giống với trình tự nucleotide của chủng virus HUA-PED45/Vietnam/2014.

Khi so sánh trình tự gene S của các chủng virus PED trong nghiên cứu này với các chủng virus PED tham chiếu khác trước đây của Việt Nam thu thập trên ngân hàng GenBank cho thấy mức độ tương đồng về nucleotide giao động từ 96,2 - 98,6%, có đến 17 sự sai khác về trình tự gene ở các vị trí khác nhau (1539: A↔C, 1556: A↔G, 1557: T↔C, 1563: T↔G, 1615: T↔C, 1617: T↔G, 1646: T↔G, 1656: T↔C, 1660: A↔C, 1664: A↔C, 1679: T↔G, 1680: G↔T, 1689: A↔C, 1694: A↔G; 1928: G↔A, 2016: C↔T, 2019: G↔A) khi so với chủng virus VN/JFP1013-1/2013/Vinh An/Vietnam (mã số truy cập ngân hàng GenBank: KJ960178). Khi so sánh với chủng virus vaccine CV777 của Trung Quốc (mã số truy cập ngân hàng GenBank: JN599150), mức độ tương đồng về trình tự gene S giao động từ 95,3 - 96,8% (Bảng 3 và Hình 2).

Ngoài việc phân tích về trình tự nt chúng tôi cũng tiến hành phân tích về trình tự aa suy diễn (deduced amino acid) của gene S của các chủng virus PED. Kết quả phân tích về trình tự amino acid của gene S ở bảng 3 và hình 3 cho thấy hai chủng virus PED thu thập được ở Thái Bình năm 2013 có sự tương đồng cao với nhau (98,8%), chỉ có 2 vị trí sai khác về axit amin (639: Serin↔Phenylalanin; 663: Tyrosin↔Asparagin). Khi so sánh sự tương đồng về trình tự axit amin của hai chủng này với chủng virus PED thu thập được ở Thái Nguyên năm 2014 cho thấy sự tương đồng tương ứng là 95,3% và 96,5% với sự sai khác axit amin ở 4 vị trí (519: Asp↔Gly, 520: His↔Pro, 604: Glu↔Asp và 643: Gly↔Asp). Tương tự khi so sánh với các chủng virus PED thu thập được ở Quảng Trị năm 2014 cho thấy mức độ tương đồng về axit amin giao động từ 95,3 - 98,2%. Có sự thay đổi đặc biệt của tất cả các trình tự amino acid của các chủng virus PED thu thập được ở Quảng Trị năm 2014 là ở vị trí thứ 516, Alanin được thay thế bởi Serin khi so sánh với trình tự tương ứng của các chủng virus PED ở Việt Nam đã được công bố trước đây và 3 chủng virus PED thu thập được trong nghiên cứu này tại hai tỉnh ở miền Bắc là Thái Bình và Thái Nguyên.

Khi so sánh về trình tự amino acid của gene S giữa các chủng virus PED trong nghiên cứu

này với chủng virus vaccine CV777 của Trung Quốc, mức độ tương đồng giao động từ 95,9 - 97,6%, có 5 vị trí sai khác chính về trình tự axit amin (519: Asp↔Gly, 547: Ile↔Thr, 594: Ser↔Gly, 632: Glu↔Gln và 643: Gln↔Asp). Đối với chủng virus vaccine DR13 tham chiếu của Hàn Quốc (mã số truy cập ngân hàng GenBank: DQ462404), mức độ tương đồng của các chủng virus PED trong nghiên cứu này với chủng DR13 giao động từ 95,1 - 96,7% về nucleotide và trong khoảng 95,3 - 97% về axit amin (Bảng 3 và Hình 3).

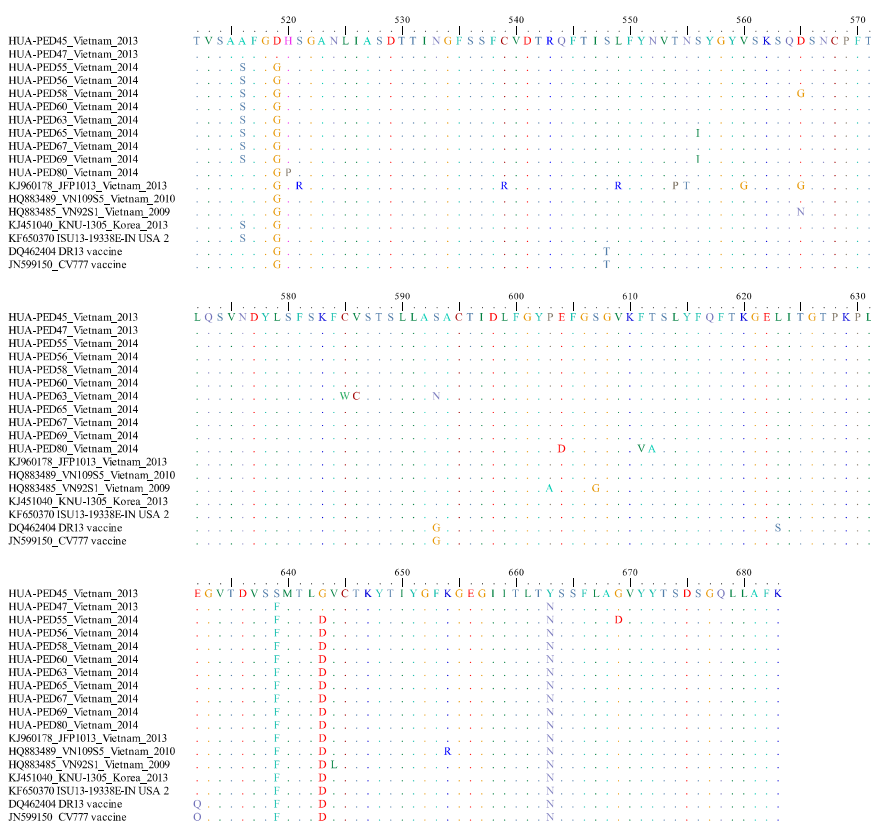
Các nghiên cứu trước đây về cây phả hệ cho thấy virus PED được phân thành 3 nhóm (group) lớn gồm G1, G2, G3 trong đó G1 được chia thành 3 nhóm phụ bao gồm G1-1, G1-2, G1-3 (Park et al., 2007). Trong nghiên cứu này các chủng virus PED thu thập được từ 3 tỉnh là Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình từ năm 2013 - 2014 đều thuộc nhóm phụ G1-1 (Hình 3.3), trong đó các chủng virus PED thu thập được ở 2 tỉnh Thái Bình và Thái Nguyên trong năm 2013 và 2014 có mối quan hệ gần gũi với các chủng virus PED phân lập được ở Việt Nam trước đây và nằm trong cùng 1 nhánh, trong khi các chủng virus PED thu thập được ở Quảng Trị trong năm 2014 lại nằm cùng nhánh với các chủng virus PED mới được phân lập tại Trung Quốc trong năm 2011 - 2012 và đặc biệt là các chủng virus được phân lập tại Mỹ và Hàn Quốc trong các đợt dịch PED nổ ra vào năm 2013 và 2014. Do đó, dịch PED lưu hành tại miền Bắc và bắc Trung bộ có thể tồn tại ít nhất 2 biến chủng thuộc nhóm phụ G1-1.

4. THẢO LUẬN

Dịch tiêu chảy cấp ở lợn do virus PED gây ra là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn ở nhiều quốc gia trên thế giới. Tuy nhiên, ở Việt Nam, các nghiên cứu về dịch PED còn ít và chưa được quan tâm nhiều. Triệu chứng lâm sàng của dịch PED rất dễ nhầm lẫn với các bệnh tiêu chảy khác, đặc biệt là bệnh viêm dạ dày ruột truyền nhiễm (TGE), do đó, việc chẩn đoán bệnh gặp nhiều khó khăn. Trong nghiên cứu này, phương pháp sinh học phân tử

RT-PCR cũng đã được ứng dụng thành công để chẩn đoán virus gây ra dịch PED. Kết quả chẩn đoán cho thấy tỉ lệ nhiễm virus PED trung bình ở cả 3 tỉnh Thái Bình, Thái Nguyên và Quảng Trị là 38,51%. Kết quả chẩn đoán thu được trong nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả chẩn đoán virus PED được công bố trước đây bởi Nguyễn Tất Toàn và cs. (2012), 41,9% dương tính với virus PED trong tổng số những nguyên

nhân gây tiêu chảy ở các đàn lợn nuôi tại các tỉnh miền Đông Nam Bộ. Những nghiên cứu gần đây tại Việt Nam cho thấy virus PED là nguyên nhân chủ yếu gây bùng phát dịch tiêu chảy trên lợn trong năm 2009 - 2010 (Duy et al., 2011, Vui et al., 2014). Kết quả thu được từ nghiên cứu này một lần nữa cho thấy dịch tiêu chảy cấp trên lợn (PED) đã và đang xuất hiện phổ biến ở Việt Nam.

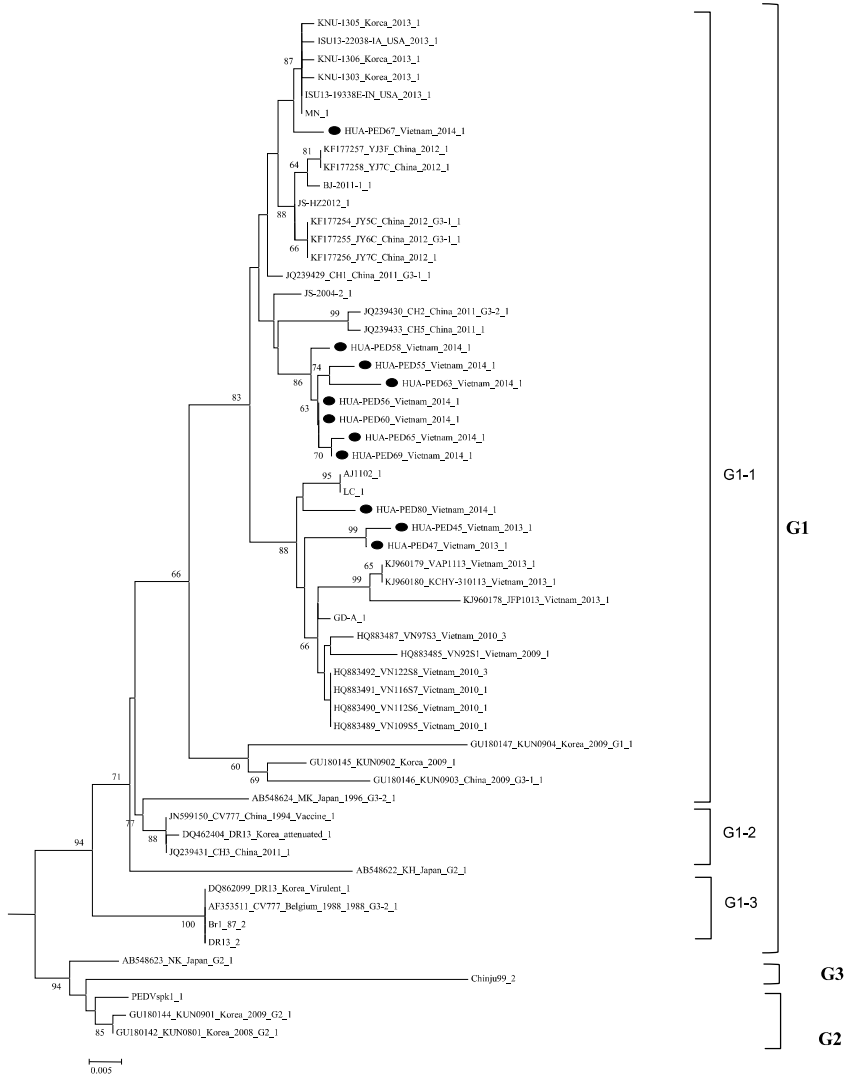


Hình 3. So sánh trình tự aa suy diễn của gene S giữa các chủng virus PED trong nghiên cứu này với nhau và với các chủng virus PED tham chiếu khác

Gi chú: Dấu (.) biểu thị trình tự nucleotide giống với trình tự nucleotide của chủng virus HUA-PED45/Vietnam/2014.

Bảng 3. Tỷ lệ (%) tương đồng về thành phần nucleotide (dưới đường chéo) và amino acid (trên đường chéo) của gene S của các chủng virus PED trong nghiên cứu này với nhau và với các chủng virus PED tham chiếu khác

STT	Trình tự	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	HUA-PED45_Vietnam_2013		98,8	96,5	97	96,5	97	95,3	96,5	97	96,5	95,3	93,6	97	95,3	97	97	95,3	95,9
2	HUA-PED47_Vietnam_2013	99,6		97,6	98,2	97,6	98,2	96,5	97,6	98,2	97,6	96,5	94,7	98,2	96,5	98,2	98,2	96,5	97
3	HUA-PED55_Vietnam_2014	96,3	96,7		99,4	98,8	99,4	97,6	98,8	99,4	98,8	96,5	94,7	98,2	96,5	99,4	99,4	96,5	97
4	HUA-PED56_Vietnam_2014	96,5	96,8	99,4		99,4	100	98,2	99,4	100	99,4	97	95,3	98,8	97	100	100	97	97,6
5	HUA-PED58_Vietnam_2014	96,1	96,5	99	99,6		99,4	97,6	98,8	99,4	98,8	96,5	95,9	98,2	97	99,4	99,4	96,5	97
6	HUA-PED60_Vietnam_2014	96,5	96,8	99,4	100	99,6		98,2	99,4	100	99,4	97	95,3	98,8	97	100	100	97	97,6
7	HUA-PED63_Vietnam_2014	95,9	96,3	98,8	99	98,6	99		97,6	98,2	97,6	95,3	93,6	97	95,3	98,2	98,2	95,9	96,5
8	HUA-PED65_Vietnam_2014	96,1	96,5	99	99,6	99,2	99,6	98,6		99,4	100	96,5	94,7	98,2	96,5	99,4	99,4	96,5	97
9	HUA-PED67_Vietnam_2014	97,2	97,6	98,2	98,8	98,4	98,8	97,8	98,4		99,4	97	95,3	98,8	97	100	100	97	97,6
10	HUA-PED69_Vietnam_2014	96,3	96,7	99,2	99,8	99,4	99,8	98,8	99,8	98,6		96,5	94,7	98,2	96,5	99,4	99,4	96,5	97
11	HUA-PED80_Vietnam_2014	97,4	97,8	97,2	97,4	97	97,4	96,8	97	97,8	97,2		93,6	97	95,3	97	97	95,3	95,9
12	KJ960178_JFP1013_Vietnam_2013	96,3	96,7	95,3	95,9	95,9	95,9	94,9	95,5	96,3	95,7	96,5		95,3	94,1	95,3	95,3	93,6	94,1
13	HO883489_VN109S5_Vietnam_2010	98,2	98,6	97,2	97,8	97,4	97,8	96,8	97,4	98,2	97,6	98,4	97,6		97	98,8	98,8	97	97,6
14	HO883485_VN92S1_Vietnam_2009	97,2	97,6	96,3	96,8	96,5	96,8	95,9	96,5	97,2	96,7	97,4	96,7	98,6		97	97	95,3	95,9
15	KJ451040_KNU-1305_Korea_2013	97,2	97,6	97,4	98	98	98	97	97,6	99,2	97,8	97,4	95,9	97,8	96,8		100	97	97,6
16	KF650370_ISU13-19338E-IN USA 2013	97,4	97,8	97,6	98,2	98,2	98,2	97,2	97,8	99,4	98	97,6	96,1	98	97	99,8		97	97,6
17	DQ462404_DR13 vaccine	95,1	95,5	96,5	96,7	96,7	96,7	95,7	96,3	96,5	96,5	96,1	94,5	96,5	95,5	96,5	96,7		99,4
18	JN599150_CV777 vaccine	95,3	95,7	96,7	96,8	96,8	96,8	95,9	96,5	96,7	96,7	96,3	94,7	96,7	95,7	96,7	96,8	99,8	



Hình 4. Mối quan hệ di truyền giữa các chủng virus PED trong nghiên cứu này với nhau và với các chủng virus PED tham chiếu khác

Ghi chú: Những chủng virus PED sử dụng trong nghiên cứu này được đánh dấu hình tròn (●)

Protein S của các coronavirus là một nhóm glycoprotein liên quan đến vỏ của virus, đóng vai trò một thụ thể bề mặt khi tương tác với tế bào chủ trong quá trình xâm nhiễm và có chứa các nhóm quyết định kháng nguyên sinh kháng thể trung hoà. Protein S của virus PED bao gồm 1.383 amino acid và có thể chia thành 2 vùng S1 (1-789 aa) và S2 (790 - 1,383 aa) (Laude, 1994). Đoạn gene được nhân lên bằng phản ứng RT-PCR sử dụng cặp mồi P1/P2 trong nghiên cứu này thuộc vùng đầu C của S1 (495 - 697 aa), có chứa nhóm quyết định kháng nguyên sinh kháng thể trung hoà và là đoạn gene thường xuyên biến đổi. Trình tự amino acid suy diễn của đoạn gene này chứa một phần đoạn kháng nguyên COE (499 - 638 aa) và một phần đoạn kháng nguyên S1D (636 - 789 aa) (Chang et al., 2002; Kim et al., 2001; Sun et al., 2008). Đột biến các vị trí amino acid ở vùng quyết định kháng nguyên của virus PED có thể dẫn đến làm giảm khả năng bảo hộ của vaccine đối với các chủng thực địa. Trong nghiên cứu này các chủng virus PED phân lập được ở Quảng Trị đều có sự thay thế Alanin bởi Serin (vị trí 516) tương tự như các chủng đang lưu hành tại Hàn Quốc và Mỹ (Hình 3).

Các nghiên cứu về dịch tễ học phân tử cho thấy virus gây ra dịch tiêu chảy cấp trên lợn (PED) được phân thành 3 nhóm (group) lớn gồm G1, G2, G3, trong đó G1 được chia thành 3 nhóm phụ bao gồm G1-1, G1-2, G1-3 (Park et al., 2007). Kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy tất cả các chủng virus PED trong nghiên cứu này đều thuộc nhóm phụ G1-1, có cùng nhánh với các chủng virus PED đang lưu hành phổ biến ở các nước thuộc khu vực Đông Nam Á và Đông Á. Nghiên cứu này một lần nữa khẳng định mối quan hệ gần gũi của các chủng virus PED ở Việt Nam với các nước trong khu vực (Duy và cs., 2011, Nguyễn Tất Toàn và Đỗ Tiến Duy, 2012). Ba chủng virus PED được phân lập ở miền Bắc (2 chủng Thái Bình và 1 chủng Thái Nguyên) có mối quan hệ gần gũi với nhau và với các chủng virus phân lập được trong nước trước đây (đại diện là chủng VN/JFP1013-

1/2013/Vinh An/Vietnam, mã số truy cập ngân hàng GenBank là KJ960178) cũng như với chủng virus PED phân lập được ở Trung Quốc năm 2012 (chủng AJ1102, mã số truy cập trên ngân hàng GenBank là JX188454). Trong khi đó, các chủng virus PED phân lập được ở Quảng Trị năm 2014 lại có mối quan hệ gần gũi hơn với các chủng virus gây ra dịch PED ở Trung Quốc, Mỹ và Hàn Quốc trong những năm gần đây (Hình 3).

Các chủng virus PED gây ra các đợt dịch gần đây ở Mỹ và Hàn Quốc được cho là có nguồn gốc từ các chủng virus lưu hành tại Trung Quốc (Chen et al., 2014; Lee and Lee, 2014). Do sự gần gũi về mặt địa lý, các biến chủng virus PED mới xuất hiện ở Việt Nam có thể có nguồn gốc trực tiếp từ Trung Quốc. Việc chưa phát hiện các biến chủng mới tại các tỉnh phía Bắc có thể do số lượng mẫu trong nghiên cứu này chưa mang tính đại diện, cũng như thiếu các nghiên cứu, điều tra đầy đủ về đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng virus PED đang lưu hành tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, kết quả phân tích một phần gene S mã hóa protein S cho thấy có ít nhất 2 biến chủng lưu hành tại miền Bắc và Bắc Trung Bộ, tương tự với nghiên cứu của Kim et al. (2015).

5. KẾT LUẬN

- Phương pháp RT-PCR đã được sử dụng để chẩn đoán virus gây ra dịch tiêu chảy cấp tính trên lợn (Porcine Epidemic Diarrhea - PED) tại Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình từ năm 2013 - 2014. Kết quả chẩn đoán cho thấy 57/148 (38,51%) mẫu bệnh phẩm dương tính với virus PED.

- Kết quả phân tích trình tự nt và aa của gene S (spike gene) cho thấy các chủng virus PED trong nghiên cứu này có tỷ lệ tương đồng nt từ 94,8 - 98,6% và aa từ 93,5 - 98,8% khi so sánh với các chủng virus PED tham chiếu khác trước đây của Việt Nam. Phân tích cây phả hệ cho thấy các chủng virus PED trong nghiên cứu này thuộc nhóm G1-1.

LỜI CẢM ƠN

Bài báo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài “*Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học phân tử của các chủng virus gây ra dịch tiêu chảy cấp ở lợn đang lưu hành ở Việt Nam và ứng dụng trong chẩn đoán và định hướng sản xuất vaccine*” do Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) tài trợ, mã số đề tài là 106-NN.04-2014.16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chang, S.-H., Bae, J.-L., Kang, T.-J., Kim, J., Chung, G.-H., Lim, C.-W., Laude, H., Yang, M.-S. and Jang, Y.-S. (2002). Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Molecules and Cells*, 14: 295 - 299.
- Chen, J.-F., Sun, D.-B., Wang, C.-B., Shi, H.-Y., Cui, X.-C., Liu, S.-W., Qiu, H.-J. and Feng, L. (2008). Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. *Virus genes*, 36: 355 - 364.
- Chen, J., Wang, C., Shi, H., Qiu, H., Liu, S., Chen, X., Zhang, Z. and Feng, L. (2010). Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Archives of virology*, 155: 1471 - 1476..
- Chen, Q., Li, G., Stasko, J., Thomas, J.T., Stensland, W.R., Pillatzki, A.E., Gauger, P.C., Schwartz, K.J., Madson, D. and Yoon, K.-J. (2014). Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *Journal of clinical microbiology*, 52: 234 - 243.
- Dong-Kyu Lee, C.-K.P., Seong-Hee Kim, Changhee Lee (2010). Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Research*, 149: 175 - 182.
- Dongbo Sun, L.F., Hongyan Shi, Jianfei Chen, Xiaochen Cui, and Hongyan Chen, S.L., Youen Tong, Yunfeng Wang, Guangzhi Tong (2008). Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Veterinary Microbiology*, 131: 73 - 81.
- Duarte, M. and Laude, H. (1994). Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *Journal of general virology*, 75: 1195.
- Duarte, M., Tobler, K., Bridgen, A., Rasschaert, D., Ackermann, M. and Laude, H. (1994). Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. *Virology*, 198: 466 - 476.
- Duy, DT., Toan, NT., Puranaveja, S., Thanawongnuwech, R. (2011). Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks. *Thai J Vet Med.*, 41(1): 55 - 64.
- Godet, M., Grosclaude, J., Delmas, B. and Laude, H. (1994). Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. *Journal of virology*, 68: 8008 - 8016.
- Kim, S.Y., Song, D.S. and Park, B.K. (2001). Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 13: 516 - 520.
- Kim, Y. K., Lim, S. I., Lim, J. A., Cho, I. S., Park, E. H., Le, V. P., Hien, N. B., Thach, P. N., Quynh, D. H., Vui, T. Q., Tien, N. T. and An, D. J. (2015). A novel strain of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnamese pigs. *Archives of virology*, 160(6): 1573 - 1577.
- Laude, H. and Vautherot, J.-F.o. (1993). Coronaviruses (molecular biology and virus-host interactions). *Advances in experimental medicine and biology*.
- Laude, M.D.a.H. (1994). Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *Journal of general virology*, 75: 1195 - 1200.
- Lee, S. and Lee, C. (2014). Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerging infectious diseases*, 20: 1223.
- Nguyễn Tấn Toàn, Đỗ Tiến Duy (2012). Đặc trưng kiểu gen của virus gây bệnh tiêu chảy cấp (PEDV) trên heo ở một số tỉnh miền Đông Nam Bộ. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 19(7): 34 - 41.
- Nguyễn Tấn Toàn, Nguyễn Đình Quát, Trịnh Thị Thanh Huyền, Đỗ Tiến Duy, Trần Thị Dân, Nguyễn Thị Phước Ninh, Nguyễn Thị Thu Năm (2012). Phát hiện virus gây tiêu chảy cấp (PEDV) trên heo ở các tỉnh miền Đông Nam Bộ. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 19(5): 23 - 28.
- Park, S.-J., Moon, H.-J., Yang, J.-S., Lee, C.-S., Song, D.-S., Kang, B.-K. and Park, B.-K. (2007). Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus genes*, 35: 321 - 332.
- Pensaert, M.B. and De Bouck, P. (1978). A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of virology*, 58: 243 - 247.
- Puranaveja, S., Poolperm, P., Lertwatcharasarakul, P., Kesdaengsakonwut, S., Boonsoongnern, A., Urairong, K., Kitikoon, P., Choojai, P., Kedkovid, R. and Teankum, K. (2009). Chinese-like strain of

Một số đặc điểm sinh học phân tử của virus gây ra dịch tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea - PED) tại Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình từ năm 2013 - 2014

- porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. *Emerging infectious diseases*, 15: 1112.
- Song, D. and Park, B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus genes*, 44: 167 - 175.
- Spaan, W., Cavanagh, D. and Horzinek, M.C. (1988). Coronaviruses: structure and genome expression. *Journal of general virology*, 69: 2939 - 2952.
- Sun, D., Feng, L., Shi, H., Chen, J., Cui, X., Chen, H., Liu, S., Tong, Y., Wang, Y. and Tong, G. (2008). Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Veterinary microbiology*, 131: 73 - 81.
- Vui, D.T., Tung, N., Inui, K., Slater, S. and Nilubol, D. (2014). Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnam. *Genome announcements* 2, e00753-14.